CE

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Tyrosinase Clone T311 Ready-to-Use (Dako Autostainer/Autostainer Plus)

Code IS061

English

Intended use

For in vitro diagnostic use.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Tyrosinase, Clone T311, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), is intended for use in immunohistochemistry together with Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments. This antibody is useful for the identification of melanocytic lesions and melanoma. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Synonyms for antigen

T311; EC 1.14.18.1

Summary and explanation

Tyrosinase is a copper-glycoenzyme involved in the production of melanin pigments, including both eumelanin and pheomelanin (1,3). In this process tyrosinase catalyzes the hydroxylation of L-tyrosine to L-dopa and the oxidation of L-dopa to L-dopaquinone (1,3). As a marker of melanocytic lineage, tyrosinase is localized to melanocytes which can be found on the dermal/epidermal junction of normal skin, but is not detected in other normal cells (2). Pigmented parts of the eye such as the choroid and iris also contain melanocytes. Expression of tyrosinase is also found in melanocytic lesions including benign nevi and the majority of primary and metastatic malignant melanomas, and not in non-melanocytic tumor types (2,4,5). Additionally, tyrosinase can be recognized by autologous cytotoxic T-cells from melanoma patients, and therefore tyrosinase peptides have utility in melanoma vaccines (6,7).

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

Reagent provided

Ready-to-use monoclonal mouse antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L NaN_3.

Clone: T311 Isotype: IgG2a, kappa

Immunogen

Purified recombinant unglycosylated tyrosinase protein consisting of 452 amino acids of the 511 amino acid mature human tyrosinase protein (1)

Specificity

Immunoblotting was performed using L-cells transfected with the tyrosinase gene and on four cell lines that express tyrosinase mRNA: SK-MEL-13, SK-MEL-19, SK-MEL-30 and SK-MEL-37 (1). Consistent with previous reports, a cluster of proteins ranging from 70-80 kDa was recognized by clone T311 in immunoblots of all five cell lines (1). An additional 55 kDa band was stained in blots from cell lines that are strongly reactive (SK-MEL-19) (1). Furthermore, immunoblots of untransfected L-cells and three cell lines that do not express tyrosinase mRNA (MZ2-MEL3.1, SK-MEL-187 and MZ2-MEL2.2) were negative with clone T311 (1). L-cells transfected with the tyrosinase-related protein 1, TRP-1(gp75), were also unreactive with clone T311 in immunofluorescent and immunoblotting assays, indicating this antibody does not cross react with the melanosome-associated protein, TRP-1(gp75) (1).

Precautions

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN_3), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.

Specimen preparation including materials required but not supplied

The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm.

Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8010/K8014).

Deparaffinized sections: Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link (Code PT100/PT101). For details, please refer to the PT Link User Guide.

Follow the pre-treatment procedure outlined in the package insert for EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8010/K8014). The following parameters should be used for PT Link: Pre-heat temperature: 65 °C; epitope retrieval temperature and time: 97 °C for 20 (±1) minutes; cool down to 65 °C. Rinse sections with diluted room temperature EnVision™ FLEX Wash Buffer (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8010).

Paraffin-embedded sections: As alternative specimen preparation, both deparaffinization and epitope retrieval can be performed in the PT Link using a modified procedure. See the PT Link User Guide for instructions. After the staining procedure has been completed, the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting medium.

The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of Dako Silanized Slides (Code S3003) is recommended.

Staining procedure including materials required but not supplied

The recommended visualization system is EnVision™ FLEX, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8010). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the software of Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments, using the following protocols:

Template protocol: FLEXRTU2 (200 uL dispense volume) or FLEXRTU3 (300 uL dispense volume)

Autoprogram (without counterstaining): Tyr or Autoprogram (with counterstaining): TyrH

The Auxiliary step should be set to “rinse buffer” in staining runs with ≤10 slides. For staining runs with >10 slides the Auxiliary step should be set to “none.” This ascertains comparable wash times.

All incubation steps should be performed at room temperature. For details, please refer to the Operator’s Manual for the dedicated instrument. If the protocols are not available on the used Dako Autostainer instrument, please contact Dako Technical Services.

Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be determined by each individual laboratory. If the evaluating pathologist should desire a different staining intensity, a Dako Application Specialist/Technical Service Specialist can be contacted for information on re-programming of the protocol. Verify that the performance of the adjusted protocol is still valid by evaluating that the staining pattern is identical to the staining pattern described in “Performance characteristics.”

Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8018). Non-aqueous, permanent mounting medium is recommended.

Positive and negative controls should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include melanocytes of the basal layer and the cells/structures should display reaction patterns as described for this tissue in “Performance characteristics” in all positive specimens. The recommended negative control reagent is FLEX Negative Control, Mouse (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code IS750).

Staining interpretation

The cellular staining pattern is cytoplasmic and/or perinuclear.

Performance characteristics

Normal tissues: A panel of 33 normal tissues was tested with anti-Tyrosinase clone T311 using immunohistochemistry, and only skin was positive (2). In normal skin, melanocytes were immunoreactive, while basal keratinocytes of the skin remained negative (1,2).

Abnormal tissues: Clone T311 was tested on benign and malignant melanocytic lesions and was found to stain the majority of benign nevi and melanomas tested. Low tyrosinase immunoreactivity was observed in melanomas of the desmoplastic and spindle cell type (1,2,4,5). The specificity of anti-Tyrosinase for melanocytic lesions has been demonstrated by immunostaining more than 70 different non-melanocytic tumors types with no immunoreactivity found, indicating that expression of tyrosinase is restricted to cells of melanocytic lineage (2).

Français — Réf. IS061

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique in vitro.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Tyrosinase, clone T311, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), est destiné à une utilisation en immunohistochimie avec les instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus. Cet anticorps est précieux pour l'identification des lésions mélanocytaires et des mélanomes. L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.

Synonymes de l'antigène

T311 ; EC 1.14.18.1

Résumé et explication

La tyrosinase est une enzyme glycosylée contenant du cuivre et impliquée dans la production des pigments de mélanine, y compris l'eumélanine et la phéomélanine (1,3). Lors du processus, la tyrosinase catalyse l'hydroxylation de la L-tyrosine en L-dopa et l'oxydation de la L-dopa en L-dopaquinone (1,3). En tant que marqueur du lignage mélanocytaire, la tyrosinase est localisée dans les mélanocytes situés au niveau de la jonction derme/épiderme de la peau saine mais elle n'est pas détectée dans d'autres cellules (2). Les parties pigmentées de l'œil telles que la choroïde et l'iris contiennent également des mélanocytes. La tyrosinase est également exprimée dans les lésions mélanocytaires, y compris les grains de beauté bénins et dans la majorité des mélanomes malins primaires et métastatiques mais elle n'est pas exprimée dans les types de tumeurs non métastatiques (2,4,5). De plus, la tyrosinase peut être reconnue par les lymphocytes T cytotoxiques autologues chez des patients atteints de mélanomes et, par conséquent, les peptides de la tyrosinase sont utiles dans les vaccins contre le mélanome (6,7).

Se référer aux *Instructions générales de coloration immunohistochimique* de Dako ou aux instructions du système de détection relatives aux procédures IHC pour plus d'informations concernant les points suivants : 1) Principe de procédure, 2) Matériels requis mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation des échantillons, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle qualité, 7) Dépannage, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.

Réactifs fournis

Anticorps monoclonal de souris prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium.

Clone : T311 Isotype : IgG2a, kappa

Immunogène

Protéine tyrosinase purifiée non glycosylée recombinante composée de 452 acides aminés provenant de la protéine tyrosinase humaine mature de 511 acides aminés (1)

Spécificité

Un immunoblot a été réalisé à l'aide de cellules-L transfectées avec le gène de la tyrosinase et sur quatre lignées cellulaires exprimant l'ARNm de la tyrosinase : SK-MEL-13, SK-MEL-19, SK-MEL-30 et SK-MEL-37 (1). Conformément à des rapports antérieurs, un groupe de protéines de poids moléculaire allant de 70 à 80 kDa ont été reconnues par le clone T311 dans les immunoblots des cinq lignées cellulaires (1). Une bande supplémentaire de 55 kDa était colorée dans les blots des lignées cellulaires fortement positives (SK-MEL-19) (1). En outre, les immunoblots de cellules-L non transfectées et de trois lignées cellulaires (MZ2-MEL3.1, SK-MEL-187 et MZ2-MEL2.2) n'exprimant pas l'ARNm de la tyrosinase étaient négatives au clone T311 (1). Les cellules-L transfectées avec la protéine 1 liée à la tyrosinase, TRP-1(gp75), n'ont pas non plus réagi au clone T311 lors de tests d'immunofluorescence et d'immunoblot, ce qui indique que l'anticorps ne présente pas de réaction croisée à la protéine associée aux mélanosomes, TRP-1(gp75) (1).

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
3. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.
4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

Conservation

Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié à l'anticorps, contacter l'assistance technique de Dako.

Préparation des échantillons y compris le matériel requis mais non fourni

L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus inclus en paraffine et fixés au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons de tissu doit être d'environ 4 µm.

Le prétraitement avec un démasquage d'épitope induit par la chaleur (HIER) est nécessaire. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x), (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8010/K8014).

Coupes déparaffinées : Le pré-traitement des coupes de tissus déparaffinés fixés au formol et inclus en paraffine est recommandé à l'aide du Dako PT Link (Réf. PT100/PT101). Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link.

Suivre la procédure de pré-traitement indiquée dans la notice pour la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x), (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8010/K8014). Les paramètres suivants doivent être utilisés pour le PT Link : Température de préchauffage : 65 °C; température et durée de restauration de l'épitope : 97 °C pour 20 (±1) minutes ; laisser refroidir jusqu'à 65 °C. Rincer les coupes avec un EnVision™ FLEX Wash Buffer (10x), dilué à température ambiante (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8010).

Coupes incluses en paraffine : Comme préparation alternative des échantillons, le déparaffinage et la restauration de l'épitope peuvent être réalisés dans le PT Link à l'aide d'une procédure modifiée. Se référer aux instructions du Guide d'utilisation du PT Link. Une fois que la procédure de coloration est terminée, les coupes doivent être déshydratées, lavées et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent.

Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ou lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser des lames Dako Silanized Slides (Réf. S3003).

Procédure de coloration y compris le matériel requis mais non fourni

Le système de visualisation recommandé est le EnVision™ FLEX, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8010). Les étapes de coloration et d'incubation sont préprogrammées dans le logiciel des instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus, à l'aide des protocoles suivants :

Protocole modèle : FLEXRTU2 (volume de distribution de 200 µl) ou FLEXRTU3 (volume de distribution de 300 µl)

Autoprogram (sans contre-coloration) : Tyr ou Autoprogram (avec contre-coloration) : TyrH

L'étape Auxiliary doit être réglée sur « rinse buffer » lors des cycles de coloration avec ≤10 lames. Pour les cycles de coloration de >10 lames, l'étape Auxiliary doit être réglée sur « none ». Cela confirme des temps de lavage comparables.

Toutes les étapes d'incubation doivent être effectuées à température ambiante. Pour plus de détails, se référer au Manuel de l'opérateur spécifique à l'instrument. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur l'instrument Dako Autostainer utilisé, contacter le service technique de Dako.

Les conditions optimales peuvent varier en fonction du prélèvement et des méthodes de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire individuellement. Si le pathologiste qui réalise l'évaluation désire une intensité de coloration différente, un spécialiste d'application/spécialiste du service technique de Dako peut être contacté pour obtenir des informations sur la re-programmation du protocole. Vérifier que l'exécution du protocole modifié est toujours valide en vérifiant que le schéma de coloration est identique au schéma de coloration décrit dans les « Caractéristiques de performance ».

Il est recommandé d'effectuer une contre-coloration à l'aide d'hématoxyline EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8018). L'utilisation d'un milieu de montage permanent non aqueux est recommandée.

Des contrôles positifs et négatifs doivent être réalisés en même temps et avec le même protocole que les échantillons du patient. Le contrôle de tissu positif doit comprendre les mélanocytes de la couche basale et les cellules/structures doivent présenter des schémas de réaction tels que décrits pour ces tissus dans les « Caractéristiques de performance » pour tous les échantillons positifs. Le contrôle négatif recommandé est le FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. IS750).

Interprétation de la coloration

Le schéma de coloration cellulaire est cytoplasmique et/ou périnucléaire.

Caractéristiques de performance

Tissus sains : Un panel de 33 tissus sains a été testé avec l'anticorps anti-tyrosinase, clone T311, par immunohistochimie, et seule la peau s'est avérée positive (2). Dans la peau saine, les mélanocytes étaient immunoréactifs, alors que les kératinocytes basaux de la peau sont restés négatifs (1,2).

Tissus tumoraux : Le clone T311 a été testé sur des lésions mélanocytaires bénignes et malignes et il a marqué la majorité des grains de beauté bénins et des mélanomes testés. On a observé une faible immunoréactivité de la tyrosinase dans les mélanomes de type cellulaire fusiforme et desmoplastique (1,2,4,5). La spécificité de l'anticorps anti-tyrosinase pour les lésions mélanocytaires a été démontrée en colorant plus de 70 types de tumeurs non mélanocytaires différentes n'ayant aucune immunoréactivité. Ceci indique que l'expression de la tyrosinase est restreinte aux cellules provenant d'un lignage mélanocytaire (2).

Deutsch Code-Nr. IS061

Zweckbestimmung

Zur In-vitro-Diagnostik.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Tyrosinase, Clone T311, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) ist zur Verwendung in der Immunhistochemie in Verbindung mit Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräten bestimmt. Dieser Antikörper dient zur Erkennung von melanozytischen Läsionen und Melanomen. Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit ordnungsgemäßen Kontrollen ergänzt werden und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten vorgenommen werden.

Synonyme für das Antigen

T311, EC 1.14.18.1

Zusammenfassung und Erklärung

Tyrosinase ist ein an der Produktion von Melaninpigmenten, einschließlich Eumelanin und Pheomelanin, beteiligtes Kupfer-Glykoenzym (1,3). Hierbei katalysiert die Tyrosinase die Hydroxylierung von L-Tyrosin zu L-Dopa sowie die Oxidation von L-Dopa zu L-Dopaquinon (1,3). Als Marker für den melanozytischen Ursprung kommt Tyrosinase auf den Melanozyten aus dem Bereich der dermo-epidermalen Verbindung gesunder Haut vor, nicht jedoch in anderen gesunden Zellen (2). Pigmentierte Bereiche der Augen wie Choroidea oder Iris enthalten ebenfalls Melanozyten. Eine Tyrosinase-Expression liegt ferner in melanozytischen Läsionen wie benignen Naevi, bei der Mehrzahl der primären und metastatisierenden malignen Melanome sowie bei nicht-melanozytischen Tumortypen vor (2,4,5). Außerdem wird die Tyrosinase durch autologe zytotoxische T-Zellen von Melanompatienten erkannt, weshalb Tyrosinasepeptide in Impfstoffen gegen Melanome eingesetzt werden (6,7).

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako oder den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: 1) Verfahrensprinzip, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Probe, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlersuche und -behebung, 8) Auswertung der Färbung, 9) Allgemeine Beschränkungen.

Geliefertes Reagenz

Gebrauchsfertiger, monoklonaler Maus-Antikörper in flüssiger Form in einem Puffer, der stabilisierendes Protein und 0,015 mol/L NaN_3 enthält.

Klon: T311 Isotyp: IgG2a, Kappa

Immunogen

Gereinigtes, rekombinantes, nicht-glykosyliertes Tyrosinaseprotein aus 452 Aminosäuren des aus insgesamt 511 Aminosäuren bestehenden, reifen, humanen Tyrosinaseproteins (1)

Spezifität

Immunblotting erfolgte an mit dem Tyrosinase-Gen transfizierten L-Zellen sowie den vier Tyrosinase-mRNA exprimierenden Zelllinien SK-MEL-13, SK-MEL-19, SK-MEL-30 und SK-MEL-37 (1). In Übereinstimmung mit früheren Berichten erkannte Klon T311 in den Immunblots aller fünf Zelllinien einen Cluster von Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 70–80 kDa (1). Eine weitere 55-kDa-Bande wurde in Blots stark reaktiver Zelllinien (SK-MEL-19) gefärbt (1). Darüber hinaus waren Immunblots nicht transfizierter L-Zellen sowie die drei keine Tyrosinase-mRNA exprimierenden Zelllinien (MZ2-MEL3.1, SK-MEL-187 und MZ2-MEL2.2) mit Klon T311 negativ (1). Ferner blieben in Immunfluoreszenz- und Immunblottingtests auch mit dem tyrosinaseähnlichen Protein 1, TRP-1 (gp75), transfizierte L-Zellen mit Klon T311 unreaktiv; ein Anzeichen dafür, dass dieser Antikörper nicht mit dem melanosomassoziierten Protein TRP-1 (gp75) kreuzreagiert (1).

Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.
2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN_3), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Natriumazid kann auch in als ungefährlich eingestuften Konzentrationen mit Blei- und Kupferrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Metallazidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.
3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
4. Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer validiert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

Vorbereitung der Probe und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Der Antikörper eignet sich zur Markierung von formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.

Die Vorbehandlung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) ist erforderlich. Optimale Ergebnisse können durch Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x), (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8010/K8014) erzielt werden.

Entparaffinierte Schnitte: Die Vorbehandlung der entparaffinierten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte sollte mit Dako PT Link (Code-Nr. PT100/PT101) erfolgen. Weitere Informationen hierzu siehe PT Link-Benutzerhandbuch.

Vorbehandlung gemäß der Beschreibung in der Packungsbeilage für EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8010/K8014) durchführen. Für PT Link sollten die folgenden Parameter verwendet werden: Vorwärmtemperatur: 65 °C; Temperatur und Zeit für Epitopdemaskierung: 97 °C für 20 (±1) Minuten; auf 65 °C abkühlen lassen. Schnitte mit auf Raumtemperatur gebrachtem, verdünntem EnVision™ FLEX Wash Buffer (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8010) abspülen.

Paraffineingebettete Schnitte: Zur Probenpräparation kann für Entparaffinierung und Epitopdemaskierung im PT Link auch ein modifiziertes Verfahren verwendet werden. Weitere Informationen siehe PT Link-Benutzerhandbuch. Nach Abschluss des Färbeverfahrens müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und unter Verwendung eines permanenten Fixiermittels auf die Objektträger aufgebracht werden.

Die Gewebeschnitte dürfen während der Behandlung oder während des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens nicht austrocknen. Zur besseren Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjektträgern wird die Verwendung von Dako Silanized Slides (Code-Nr. S3003) empfohlen.

Färbeverfahren und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Das empfohlene Visualisierungssystem ist EnVision™ FLEX, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8010). Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Software der Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräte mit den folgenden Protokollen vorprogrammiert:

Matrix-Protokoll: FLEXRTU2 (200 µl Abgabevolumen) oder FLEXRTU3 (300 µl Abgabevolumen)

Autoprogram (ohne Gegenfärbung): Tyr oder Autoprogram (mit Gegenfärbung): TyrH

Bei Färbedurchläufen mit höchstens 10 Objektträgern sollte der „Zusatz“-Schritt auf „Pufferspülgang“ eingestellt werden. Für Färbedurchläufe mit mehr als 10 Objektträgern den „Zusatz“-Schritt auf „Keine“ einstellen. Dies gewährleistet vergleichbare Waschzeiten.

Alle Inkubationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Nähere Einzelheiten bitte dem Benutzerhandbuch für das jeweilige Gerät entnehmen. Wenn die Färbeprotokolle auf dem verwendeten Dako Autostainer-Gerät nicht verfügbar sind, bitte den Technischen Kundendienst von Dako verständigen.

Optimale Bedingungen können je nach Probe und Präparationsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Falls der beurteilende Pathologe eine andere Färbungsintensität wünscht, kann ein Anwendungsspezialist oder Kundendiensttechniker von Dako bei der Neuprogrammierung des Protokolls helfen. Die Leistung des angepassten Protokolls muss verifiziert werden, indem gewährleistet wird, dass das Färbemuster mit dem unter „Leistungsmerkmale“ beschriebenen Färbemuster identisch ist.

Die Gegenfärbung in Hämatoxylin sollte mit EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8018) ausgeführt werden. Empfohlen wird ein nichtwässriges, permanentes Fixiermittel.

Positiv- und Negativkontrollen sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientenproben getestet werden. Das positive Kontrollgewebe sollte Melanozyten der Basalschicht enthalten, und die Zellen/Strukturen müssen in allen positiven Proben die für dieses Gewebe unter „Leistungsmerkmale“ beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene Negativ-Kontrollreagenz ist FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. IS750).

Auswertung der Färbung

Das zelluläre Färbemuster ist zytoplasmatisch und/oder perinukleär.

Leistungsmerkmale

Gesundes Gewebe: Ein Panel von 33 gesunden Geweben wurde mit Anti-Tyrosinase, Klon T311, immunhistochemisch untersucht, wobei nur Hautgewebe eine positive Reaktion zeigte (2). In gesunder Haut waren die Melanozyten immunreaktiv, die basalen Keratinozyten der Haut blieben hingegen negativ (1,2).

Pathologisches Gewebe: Klon T311 wurde an benignen und malignen melanozytischen Läsionen getestet. Es markierte die meisten untersuchten benignen Naevi und Melanome. Eine nur geringe Tyrosinase-Immunreaktivität wurde bei desmoplastischen und Spindelzellmelanomen beobachtet (1,2,4,5). Die Spezifität von Anti-Tyrosinase für melanozytische Läsionen wurde durch Immunfärbungen an über 70 verschiedenen, nicht-melanozytischen Tumortypen aufgezeigt, die durchweg keine Immunreaktivität aufweisen, was darauf hindeutet, dass die Tyrosinase-Expression auf Zellen melanozytischen Ursprungs beschränkt ist (2).

References
Bibliographie
Literaturangaben

1. Chen YT, Stockert E, Tsang S, Coplan KA, Old LJ. Immunophenotyping of melanomas for tyrosinase: implications for vaccine development. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92(18):8125–8129
2. Jungbluth AA, Iversen K, Coplan K, Kolb D, Stockert E, Chen YT, Old LJ, Busam K. T311-an anti-tyrosinase monoclonal antibody for the detection of melanocytic lesions in paraffin embedded tissues. Pathol Res Pract 2000; 196(4):235–242
3. Garcia-Borron JC, Solano F. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. Pigment Cell Res 2002; 15(3):162–173
4. Clarkson KS, Sturdgess IC, Molyneux AJ. The usefulness of tyrosinase in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions: a comparison of the novel T311 antibody (anti-tyrosinase) with S-100, HMB45, and A103 (anti-melan-A). J Clin Pathol 2001; 54(3):196–200
5. Hofbauer GF, Kamarashev J, Geertsen R, Boni R, Dummer R. Tyrosinase immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. J Cutan Pathol 1998; 25(4):204–209
6. Slingluff CL Jr, Petroni GR, Yamshchikov GV, Barnd DL, Eastham S, Galavotti H, Patterson JW, Deacon DH, Hibbitts S, Teates D, Neese PY, Grosh WW, Chianese-Bullock KA, Woodson EM, Wiernasz CJ, Merrill P, Gibson J, Ross M, Engelhard VH. Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. J Clin Oncol 2003; 21(21):4016–4026
7. Zajac P, Oertli D, Marti W, Adamina M, Bolli M, Guller U, Noppen C, Padovan E, Schultz-Thater E, Heberer M, Spagnoli G. Phase I/II clinical trial of a nonreplicative vaccinia virus expressing multiple HLA-A0201-restricted tumor-associated epitopes and costimulatory molecules in metastatic melanoma patients. Hum Gene Ther 2003; 14(16):1497–1510

REF Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	IVD In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum
Manufacturer Fabricant Hersteller	LOT Batch code Code du lot Chargenbezeichnung	Σ Contains sufficient for <N> tests Contenu suffisant pour <n> tests Inhalt ausreichend für ‚n' Ansätze
Use by Utiliser jusque Verwendbar bis	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	EC REP Authorized representative in the European Community Représentant Autorisé dans la Communauté Européenne Autorisierter Repräsentant in der EU

PT0020/ Rev C

Dako North America, Inc.
6392 Via Real
Carpinteria, California 93013 USA

Tel 805 566 6655
Fax 805 566 6688
Technical Support 800 424 0021
Customer Service 800 235 5763

EC REP
Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup Denmark

Tel +45 4485 9500
Fax +45 4485 9595

www.dako.com

Edition 09/07